

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-099919

(43)Date of publication of application : 23.04.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/48

G01N 15/14

G01N 33/49

(21)Application number : 03-090559

(71)Applicant : HITACHI LTD
HITACHI INSTR ENG CO LTD

(22)Date of filing : 22.04.1991

(72)Inventor : HORIUCHI HIDEYUKI
YABE RYOHEI
SAKURABA SHINICHI
KANEKO NORIO
TATARA NOBUYUKI
OKI HIROSHI
YAMAZAKI ISAO
MIYAKE AKIRA

(54) LEUKOCYTE ANALYZING METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To realize the classification of five kinds of the normal leukocytes by using acridine orange fluorescence staining solution containing acridine orange fluorescence dyestuff, buffer solution whose pH is higher than physiological pH and physiological isotonic osmotic pressure reagent as analyzing fluorescence staining solution.

CONSTITUTION: When leukocyte is stained with acridine orange staining agent, the leukocyte is bonded with neucleuses present in the leukocyte and granules present in cytoplasm. The green or red fluorescence is generated. The neucleus of the cell is mainly constituted of DNA. When the neucleus is bonded with the acridine orange, the green fluorescence indicating the maximum value in the vicinity of 530nm is generated. The granule present in the cytoplasm contains RNA. Therefore, the red fluorescence having the maximum value in the vicinity of 640nm is generated. The osmotic pressure of the acridine orange fluorescence staining solution is set in the vicinity of 290mosm/kg of physiological osmotic pressure. The pH of fluorescence solution is set at a value higher than the normal physiological pH. Thus, the five of the normal leukocytes can be classified. Furthermore, a small amount of erythrocyte hemolysis agent is added into the staining solution. Thus, the surface of the cell cytoplasmic membrane of the leukocyte is changed. In this way, the fluorescence intensity is increased at normal temperature and the staining time is shortened.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.03.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2073407
[Date of registration] 25.07.1996
[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-99919

(43)公開日 平成5年(1993)4月23日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48		M 7055-2J		
15/14		C 7005-2J		
33/49		A 7055-2J		

審査請求 未請求 請求項の数5(全 8 頁)

(21)出願番号	特願平3-90559	(71)出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22)出願日	平成3年(1991)4月22日	(71)出願人	000233240 日立計測エンジニアリング株式会社 茨城県勝田市堀口字長久保832番地2
		(72)発明者	堀内 秀之 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立 製作所那珂工場内
		(72)発明者	矢部 良平 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立 製作所那珂工場内
		(74)代理人	弁理士 春日 譲

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 白血球分析方法

(57)【要約】

【目的】 レーザ光を白血球等の細胞に照射し、細胞からの緑色蛍光及び赤色蛍光により細胞の分類する方法において、分類正確度及び再現性を向上させる。

【構成】 分析蛍光染色溶液としてアクリジンオレンジ蛍光染色溶液を使用し、この染色溶液を、生理学的浸透圧条件、溶液pHを生理学的pHより高くし、更に赤血球溶血剤を溶液に添加する。代表的なアクリジンオレンジ蛍光染色溶液の成分条件を表1に示す。本発明では、生理学的等張条件のため白血球細胞の損傷が少なく、染色時間の短縮化、蛍光強度の増大、溶血剤使用による赤血球の妨害が少ない。その結果、正常白血球5分類の分類精度向上と、異型リンパ球及び幼若顆粒球の分類が可能である。

【表1】

本発明における白血球分類のための染色条件

項 目	条 件
緩 衝 液	ばう緩ナトリウム塩酸系緩衝液 0.02 M
アクリジンオレンジ濃度	0.014 ~ 0.018 mM
染 色 溶 液 pH	8.4 ~ 8.9
浸 透 圧 (NaCl)	280 ± 10 mOsm/kg
溶 血 剤 (サポニン)	0.025 ~ 0.035 %
希 釈 倍 率	11 ~ 20 倍
染 色 時 間	数10 ~ 60 秒
染 色 温 度	室温 ~ 45 °C

【特許請求の範囲】

【請求項1】 レーザ光を利用するフロー式の白血球分析方法において、予め白血球を染色するための分析蛍光染色溶液として、

(1) アクリジンオレンジ蛍光染料

(2) 溶液pHが生理的pHより高い緩衝液

(3) 生理的等張浸透圧

からなる試薬を含むアクリジンオレンジ蛍光染色溶液を使用し、白血球からの緑色蛍光及び赤色蛍光による蛍光信号の大小により、血液中の白血球の分類を行うことを特徴とする白血球分析方法。

【請求項2】 請求項1記載の白血球分析方法において、前記アクリジンオレンジ蛍光染色溶液に含まれる前記試薬が、

(1) アクリジンオレンジ蛍光染料 濃度 0.014～0.018 mM

(2) 溶液pH 8.4～8.9の緩衝液

(3) 浸透圧 290 ± 10 mosm/kg

からなることを特徴とする白血球分析方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載の白血球分析方法において、前記アクリジンオレンジ蛍光染色溶液に、溶血剤を添加したことを特徴とする白血球分析方法。

【請求項4】 請求項3記載の白血球分析方法において、前記溶血剤としてサボニンを使用し、このサボニンを0.025～0.035重量%の割合で添加したことを特徴とする白血球分析方法。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載された白血球分析用の前記アクリジンオレンジ蛍光染色溶液を用いて、5種類の正常白血球を分類し、異常球として異型リンパ球と幼若顆粒球を分類し、更に血小板凝集のある血液標本を検出することを特徴とする白血球分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、白血球分析方法に係り、特に、病院における血液学検査項目のうち白血球を分類するための白血球分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 白血球分類法について説明する。通常、血液中の白血球には、正常な白血球として、好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球の5種類のものがある。このうち好中球と好酸球と好塩基球をまとめて顆粒球という。これらの5種類の白血球は、通常末梢血に現れる正常な白血球である。これらの正常白血球以外に、通常末梢血には現れない異常血球として、異型リンパ球、幼若顆粒球、芽球等がある。

【0003】 従来、白血球分類を始めとする血液像検査は、顕微鏡下で人の目視による血球形態の観察、分類という形で行われてきた。この方法は、顕微鏡観察による人の判断に基づいて行われるため、分類処理速度が遅

く、また目の疲労も大きい。更に、検査技師間の分類解釈の相違、処理血球数が少ないことに起因して、統計的誤差が大きいなどの問題があった。

【0004】 そこで、血液像検査の自動処理装置が提案される。従来の典型的な自動処理装置で利用される方法としては、顕微鏡画像のパターン認識手法による血球分類方法である。この方法は、人間の目の代わりにTV撮像装置を用いて、顕微鏡像を電気信号に変換し、コンピュータ等による画像処理・パターン認識処理を行う。処理速度は人間よりも速いが、処理血球数を飛躍的に多くすることはできない。血液標本作成のために、メイ・ギムザ染色等による前処理に20～30分の時間を要し、全体の処理効率も、人間が処理する場合と大きく変わらない。処理血球数が少ないことに起因する統計的誤差は、特に少数血球の検査では、目視の場合と同様に大きい。少数血球の例としては、単球、好酸球、好塩基球などの正常血球と、異型リンパ球、幼若顆粒球、芽球などの異常血球がある。

【0005】 上記の問題を考慮して、最近ではフローサイトメータに代表される手法、すなわち血球にレーザ光を照射し、血球からの光散乱、光透過、蛍光強度の各信号を使い、更に従来から行われている血球カウンタによる電気抵抗情報を加え、これらのパラメータから血球分類を行うフロー方式が提案されている。これらの装置に関しては、特開昭49-89390号、特開昭61-88896号、特表昭61-502277号、特開昭54-14957号等の先行文献が存在する。

【0006】 これらの装置の特徴は、血球浮遊液をフローセル中に流し、一個一個の血球からの散乱情報及び蛍光情報を用いて処理するため、処理血球の個数が非常に多く統計的誤差が小さく、前処理時間が短いこと、更に再現性がよく、目視との相関の良い結果が得られるといった利点がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上述したフロー方式による白血球分類法には、以下に示す問題がある。電気インピーダンスや光散乱パラメータ等を利用した白血球分類法では、血球サイズ情報と血球の全体的な電気的性質とを利用するため、血球間の微妙な違いを識別することが困難である。特に、好塩基球、好酸球、単球に関しては、リンパ球又は好中球と識別することが困難な場合がある。また、これら少数血球の分類精度が、統計的に期待される精度よりも悪いことがある。更に、異常球では幼若顆粒球、異型リンパ球等の正しい分類比率を知ることができない。加えて、この方法では、特殊な試薬を必要としたり、試薬の調合・分析方法に工夫が必要である。そこで、上記のフロー方式白血球分類法では、フロー方式の上記問題を改善するため、更に、予め蛍光色素により血球を染色し、レーザ光による蛍光強度の大小から白血球分類を行うといった方法が提

案される。蛍光色素の代表的なものにアクリジンオレンジがある。この方法では、蛍光色素が、血球種類による細胞質のRNAや核のDNAに取り込まれる量の違いを、緑及び赤の蛍光強度の大きさから調べ、血球を分類する。この方法によれば、蛍光色素の細胞膜透過性の違いも影響するため、白血球の各血球種の違いを明瞭に知ることができる。この方法に関して、生理学pH及び低張溶液を使用し、染料の吸収が平衡に達する前に測定する方法は、特開昭50-75473号（特公昭59-853号）公報に開示され、染色液を生理学的条件である等張溶液を使用する方法は特開昭47-3049号公報に開示される。しかし、上記の等張溶液を使用する方法の場合には、白血球は顆粒球、単球、リンパ球の3分類しかできないという不具合があった。一方、低張溶液を使用する方法の場合には、白血球は正常な血球につき5分類と幼若顆粒球の検出が可能であるが、低張染色条件だけでは次のような問題があった。

- (1) 白血球細胞に損傷が生じることがある。
- (2) 赤の蛍光強度は一般に緑の蛍光強度に比較して弱く、色素が赤血球にも一部吸収されて赤の蛍光を発生し、白血球からの蛍光信号を妨害する。
- (3) 白血球と赤血球の比率は500:1であり、染色溶液の希釈倍率も小さいため赤血球同時通過が非常に多く、この赤血球の存在により白血球からの蛍光信号が影響を受ける。
- (4) その結果、特に、単球とリンパ球の区別を正しく行うことができない場合がある。

本発明の目的は、上記諸問題に鑑み、等張溶液を利用した白血球分類法であっても、5種類の正常な白血球の分類を実現し、更に異常球、特に異型リンパ球、幼若顆粒球の分類、及び血小板凝集のある標本の検出を可能とする白血球分析方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明に係る白血球分析方法は、レーザ光を利用するフロー式の白血球分析方法であり、予め白血球を染色するための分析蛍光染色溶液として、

- (1) アクリジンオレンジ蛍光染料
- (2) 溶液pHが生理的pHより高い緩衝液
- (3) 生理的等張浸透圧

からなる試薬を含むアクリジンオレンジ蛍光染色溶液を使用し、白血球からの緑色蛍光及び赤色蛍光による蛍光信号の大小により、血液中の白血球の分類を行うことを特徴とする。

【0009】上記の如く、本発明の白血球分析方法で使用する染色剤はアクリジンオレンジであり、一般に異染色性蛍光染料として知られている。この染色剤で白血球を染色した場合、白血球内に存在する核や細胞質に存在する顆粒と結合して、緑色又は赤色の蛍光が発生する。細胞の核は主としてDNAで構成され、アクリジンオレンジ

と結合すると530nm付近に極大値を有する緑色蛍光を出す。一方、細胞質に存在する顆粒は、RNAを含むことから640nm付近に極大を有する赤色蛍光を発する。レーザ光源としては、アクリジンオレンジの吸収極大波長480nm付近に発振線があるアルゴンイオンレーザが適している。

【0010】第1の課題である5種類の正常白血球の分類することの解決としては、アクリジンオレンジ蛍光染色溶液の浸透圧を生理的浸透圧290mosm/kg付近に設定し、染色溶液のpHを生理的pHより高く（8.4～8.9）設定することで、5種類の正常白血球を分類できることを見出した。

【0011】更に、上記染色溶液に赤血球溶血剤を少量添加することにより、白血球の細胞膜表面を変化させ、染色溶液の血球への吸収を促進する効果を持たせた結果、常温でありながら蛍光強度の増大、染色時間の短縮化が可能となった。溶血剤としては、例えばサポニン等が使用され、添加割合として0.025～0.035重量%である。

【0012】他の課題である大量赤血球同時通過による白血球信号への影響の排除については、上記赤血球溶血剤の作用により赤血球を破壊するので、この赤血球による赤色蛍光信号への妨害効果及び光散乱の影響を減少させることができた。このため問題になっていた単球とリンパ球の分離が良くなり、これら血球の分類正確度と再現性が向上する。赤血球を十分溶血させる濃度に設定すれば、白血球からの光散乱情報を利用することができ、蛍光情報と併せて分類パラメータが増大した分だけ識別精度が向上する。しかし、更に高濃度では白血球にも影響が現れ、白血球分類そのものにも影響が現れる。

【0013】また白血球分類の具体的な処理は次の通りである。まず血球からの蛍光を、光フィルターで緑色及び赤色の蛍光に分離し、光検出器で電気信号に変換した後、データ処理装置で分類作業を行う。次に、各血球から得られた緑色及び赤色蛍光強度信号に関する2次元サイトグラムを作ると、正常白血球5種類について各血球ごとに特徴あるクラスラを有するパターンが生じる。このパターンから各白血球の分類を行う。

【0014】本発明による染色溶液の条件では、正常白血球の5種類のクラスターばかりでなく、幼若顆粒球、異型リンパ球などもそれぞれ独自の位置にクラスターを形成するため、これらの異常球の分類も可能となる。また芽球が存在する血液標本では、独自のサイトグラムができ、これは正常白血球だけのサイトグラムと大きく異なるため、先の幼若顆粒球及び異型リンパ球と共に異常球を含む血液標本を見つけることができる。更に、血小板凝集のある血液標本では、血小板凝集独特のサイトグラムを生じるため、血小板凝集のある検体の検出も可能である。

【0015】

【作用】本発明による白血球分析方法では、上述したアクリジンオレンジを主成分とした染色溶液を使用した白血球分類法にて、等張溶液を使用するため、従来行われていた低張条件における白血球破壊が起らず、正確な白血球分類を行うことが可能である。しかも等張条件では従来3分類しかできなかったものを、本発明では正常白血球5分類を行うことが可能となった。

【0016】更に、少量の赤血球溶血剤を本発明による染色溶液に添加することにより、蛍光強度の増大、染色時間の短縮化が図られ、赤血球の影響を小さくすることにより、単球とリンパ球の識別が容易になった。

【0017】また、本発明の染色溶液を使用することにより、正常白血球5分類ばかりでなく、異常血球のうち異型リンパ球及び幼若顆粒球の分類が可能になった。芽球を始め、血小板凝集のある血液標本にたいしては、正常白血球5種類とは異なる2次元サイトグラムが生じるため、上述の異型リンパ球や幼若顆粒球を含め異常球が*

本発明における白血球分類のための染色条件

項 目	条 件
緩 衝 液	ほう酸ナトリウム塩酸系緩衝液 0.02 M
アクリジンオレンジ濃度	0.014 ~ 0.018 mM
染 色 溶 液 pH	8.4 ~ 8.9
浸 透 圧 (NaCl)	290 ± 10 mosm/kg
溶 血 剤 (サボニン)	0.025 ~ 0.035 %
希 釈 倍 率	11 ~ 20 倍
染 色 時 間	数10 ~ 60 秒
染 色 温 度	室温 ~ 46 °C

【0020】蛍光測定装置構成は通常のフローサイトメータと同一構成であり、レーザとしては発振波長488nmのアルゴン・イオンレーザを使用する。これは、アクリジンオレンジの吸収極大波長に一致させるためである。蛍光信号は、先に述べた緑色蛍光及び赤色蛍光波長帯を光フィルタで選択し、光検出器で電気信号に変換する。

【0021】上記実施例において、本来、赤血球溶血剤を添加しなくても、正常白血球の5種類の分類が可能である。しかし、更に赤血球溶血剤として本実施例ではサボニンを使用した。これにより、先に述べた赤血球による散乱、吸収、及び蛍光の影響を改善することができる。サボニンの濃度は、表1に示した通り0.025~0.035重量%の割合で添加すると効果が大きい。

【0022】図1において、本実施例で得られた緑色蛍光及び赤色蛍光に基づく正常白血球5種類のサイトグラ

* 存在する血液標本を検出することが可能である。

【0018】

【実施例】以下に、本発明の実施例を、発明の内容に応じて実施例1~実施例3に分けて具体的に説明する。

【実施例1】本発明における白血球分類のための染色条件の代表的な例を下記の表に示す。緩衝液としては、ほう酸ナトリウム塩酸系緩衝液を使用している。染色溶液の浸透圧は290mosm/kgと生理的な浸透圧に調整されている。染色溶液のpHは、生理的はpHより1乃至それ以上高い値にすることにより、前記特開昭47-3049号に開示された分析法による生理学的浸透圧条件では、正常白血球を3種類しか分類できなかったが、本組成にすることにより、正常白血球を5種類分類することが可能となった。

【0019】

【表1】

ム(図1(a))と、溶血剤の有無による蛍光サイトグラムの変化(図1(b), (c))を示した。図1を比較することにより、溶血剤を添加しなくても十分に正常白血球5種類の分類が可能であること、及び溶血剤添加により各血球の分離が改善されていることが分かる。

【0023】【実施例2】赤血球溶血剤によって、光散乱信号は、白血球細胞からだけのものが検出される。光散乱信号は、前方散乱光と90度方向側方散乱光を使用する。前方散乱光は血球のサイズ情報を、側方散乱信号は細胞の内部情報に対応していることが知られている。表1の染色条件を満たす染色溶液を使用したときの、光散乱信号による白血球サイトグラムは、図2に示す如くなった。図2において、横軸は側方散乱であり、縦軸は前方散乱である。クラスタとしては、3つ存在する。すなわち、リンパ球L及び好塩基球Bと、単球Mと、好酸球E及び好中球Nの3つのクラスタからなるパターンで

ある。

【0024】この光散乱信号によるクラスタ情報と、前述の蛍光によるサイトグラム情報を利用することにより、正常白血球の5分類の分類精度を改善することができる。特に、光散乱信号では単球が独立したクラスタを形成すること、及び、リンパ球と好塩基球が重なっているが、蛍光サイトグラムデータからリンパ球を正しく識別できることから、好塩基球の数を正確に知ることができる。

【0025】〔実施例3〕実施例1で示した白血球の蛍光サイトグラムには、正常白血球の5分類ばかりでなく、異常球が存在する場合、この異常球も特定の位置に存在することを見い出された。白血球蛍光サイトグラムにおける、異常球に関する代表的な特徴パターンを図3に示す。図3において、(a)は異型リンパ球(ATL)の出現例を示し、(b)は幼若顆粒球(IMG)の出現例を示し、(c)は血小板凝集の出現例を示す。

【0026】図3(a)に示す如く、異型リンパ球は、通常のリンパ球の上部(破線の円で示した箇所)、すなわち緑色蛍光のより大きい位置に分布する。この事実から、緑色蛍光強度のリンパ球位置の上部をデータ処理で切り出すことにより、異型リンパ球の個数を決定できる。

【0027】図3(b)に示す如く、幼若顆粒球は、好酸球の右側(破線の楕円で示した箇所)、赤色蛍光の大なる位置に分布する。よって好中球より小さい緑色蛍光であって、且つ好酸球より赤色強度が大なる領域を幼若顆粒球と考えることにより、幼若顆粒球数を知ることができる。

【0028】これらの異型リンパ球又は幼若顆粒球に関しては、実際の顕微鏡による目視結果と統計的誤差内で識別結果が一致することを確かめた。

【0029】図3(c)に示す如く、血小板凝集が存在する血液標本では、原点付近から右上がりの通常パターンとは異なるサイトグラムが重なって出現する。パターン認識手法などで処理することにより、この凝集パターンを検出することが可能である。同様なことは、芽球系異常血球の出現している血液標本でも、通常正常白血球

クラスタと異なるパターンが現れ、パターン認識手法で異常検体を検出することができる。

【0030】なお、前記実施例では、表1に示した緩衝剤、溶血剤としてサポニン等を中心に記述してあるが、その他の試薬において同一効果を有する緩衝剤、溶血剤であれば本発明に含まれることは明らかである。また本発明は、本発明による白血球分析方法による試薬を混合した細胞分析試薬を含むものであり、細胞分析装置で本試薬を用いて細胞分析を行うことができる。従って本発明は、白血球の分類のみに限定されず、細胞分析方法として一般的に適用することができるものである。

【0031】

【発明の効果】以上の説明で明らかなように本発明によれば、次の効果を奏する。

(1) 生理的等張条件で測定を行うことができるため、白血球細胞への損傷が少なく、正しい白血球分類が行える。

(2) 赤血球溶血剤により赤血球による吸収、散乱、蛍光などの妨害影響を受けないため、各種白血球クラスタの分化が明瞭で、血球分類の正確度が向上する。

(3) 染色時間を短縮でき、且つ採血後比較的短時間でも各白血球の分画が可能である。

(4) 蛍光強度が増大する。これは、信号検出能力を向上させ、低出力レーザの使用を可能とする。

(5) 赤血球を溶血させるため、白血球分類に光散乱の情報も利用できる。

(6) 以上の効果により、白血球正常5分類を高正確度で且つ再現性良く分類識別することができる。

(7) 異常白血球である異型リンパ球、幼若顆粒球の分類を可能とし、更に芽球を含む異常血球検体や血小板凝集検体の検出が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】白血球蛍光サイトグラムと溶血剤有無の効果を示す説明図である。

【図2】光散乱信号による白血球サイトグラムの一例を示す説明図である。

【図3】異常球が存在する血液標本の場合のサイトグラムの一例を示す説明図である。

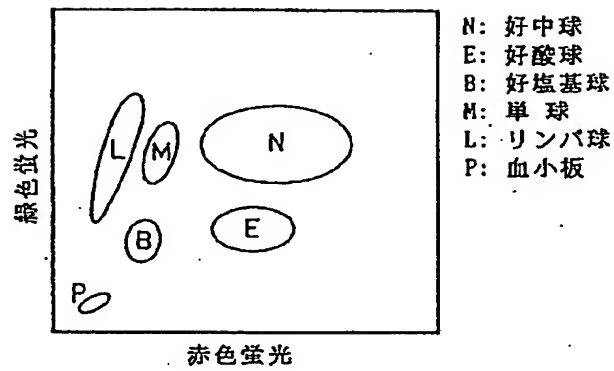
10

20

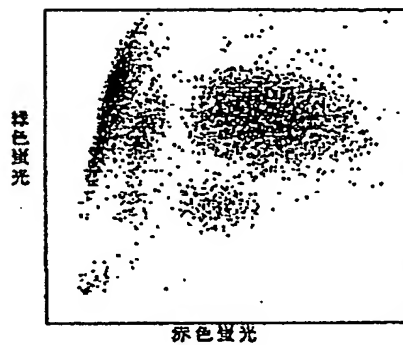
30

【図1】

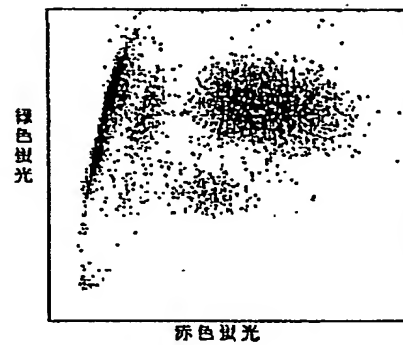
白血球蛍光サイトグラムと溶血剤有無の効果



(a) 蛍光によるサイトグラム



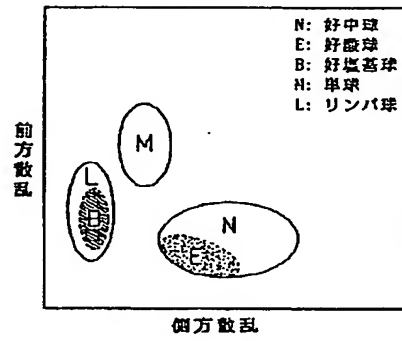
(b) 溶血剤無し



(c) 溶血剤有り

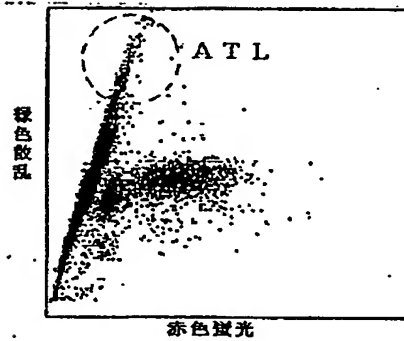
【図2】

光散乱信号による白血球サイトグラム

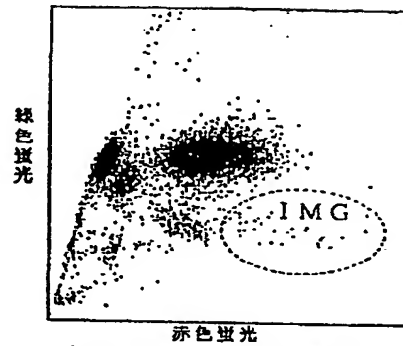
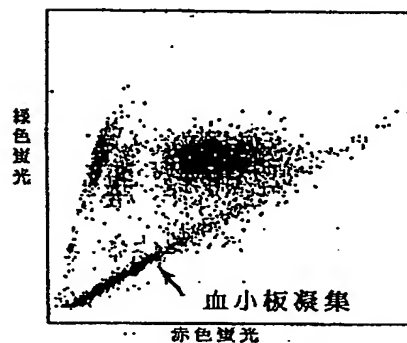


【図3】

異常血球が存在する血液標本の例



(a) 異型リンパ球 (ATL)

(b) 幼若顆粒球出現例
IMG=0.5%

(c) 血小板凝集

フロントページの続き

(72)発明者 桜庭 伸一
茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立
製作所那珂工場内

(72)発明者 金子 紀夫
茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立
製作所那珂工場内

(72)発明者 多田羅 信之
茨城県勝田市市毛882番地 日立計測エン
지니어リング株式会社内

(72)発明者 大木 博
茨城県土浦市神立町502番地 株式会社日
立製作所機械研究所内

(72)発明者 山崎 功夫
茨城県土浦市神立町502番地 株式会社日
立製作所機械研究所内

(72)発明者 三宅 亮
茨城県土浦市神立町502番地 株式会社日
立製作所機械研究所内

BEST AVAILABLE COPY